

(19)



JAPANESE PATENT OFFICE

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11) Publication number: **2001000188 A**

(43) Date of publication of application: **09.01.01**

(51) Int. Cl

C12N 15/09
A61K 31/00
A61K 39/02
A61K 39/17
A61K 39/215
C07K 14/125
C07K 14/165
C07K 14/30
C12N 7/00

(21) Application number: **11174804**

(22) Date of filing: **22.06.99**

(71) Applicant: **NIPPON ZEON CO LTD**

(72) Inventor: **KUBOMURA MAYUMI**
SAITO SHUJI

(54) **PROMOTER, RECOMBINANT CONTAINING THE SAME AND ITS UTILIZATION**

sequence and removing more than 650 bp from the 3'-terminal side of the DNA fragment.

(57) Abstract:

COPYRIGHT: (C)2001,JPO

PROBLEM TO BE SOLVED: To obtain a novel promoter which comprises a DNA molecule containing a specific base sequence and exhibiting a specific promoter activity and is used for the production, or the like, of a gene recombinant vaccine e.g. a recombinant virus, or the like, that has a short necessary domain and is highly active, safe and stable.

SOLUTION: This promoter is a novel promoter comprising a DNA molecule containing the base sequence represented by formula I or a DNA molecule which is homologous to the DNA molecule of formula I but not homologous to the DNA represented by formula II and exhibits promoter activity and is useful for the production, or the like, of a gene recombinant vaccine that has a short necessary domain, shows high activity, safety and stability and contains a recombinant virus as a main ingredient. The promoter is obtained by separating a chicken genome to prepare a genomic bank by a conventional method, using this genomic bank as a template, preparing a DNA fragment containing a β -actin promoter by PCR using a primer comprising the partial

GGGCGAGCG GAGGCGCG GCGCGCGG GCGCGAGG GCGCGCGG cccatcagag GG
CGCGCGCG CGAGGCGG GCGCGCGG GCGCGCGG GCGCGCGG cctatcagag 120
GCGCGCGG GCGCGCGG GCGCGCGG GCGCGCGG GCGCGCGG 159

I

TGCGCGCG GCGCGCGG GCGCGCGG GCGCGCGG GCGCGCGG GCGCGCGG GG
GCGCGCGG GCGCGCGG GCGCGCGG GCGCGCGG GCGCGCGG GCGCGCGG GG 103

II

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開2001-188

(P2001-188A)

(43) 公開日 平成13年1月9日 (2001.1.9)

(51) Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テーマコード [*] (参考)
C 1 2 N 15/09	Z N A	C 1 2 N 15/00	Z N A A 4 B 0 2 4
A 6 1 K 31/00	6 3 1	A 6 1 K 31/00	6 3 1 D 4 B 0 6 5
			6 3 1 K 4 C 0 8 5
39/02		39/02	4 H 0 4 5
39/17		39/17	

審査請求 未請求 請求項の数 5 O L (全 15 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願平11-174804

(22) 出願日 平成11年6月22日 (1999. 6. 22)

(71) 出願人 000229117

日本ゼオン株式会社

東京都千代田区丸の内2丁目6番1号

(72) 発明者 久保村 真由美

神奈川県川崎市川崎区夜光一丁目2番1号

日本ゼオン株式会社総合開発センター内

(72) 発明者 斎藤 修治

神奈川県川崎市川崎区夜光一丁目2番1号

日本ゼオン株式会社総合開発センター内

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 プロモーター、それを含有する組み換え体及びその利用

(57) 【要約】

【課題】 新規な高活性プロモーターを提供することにある。

【解決手段】 β -アクチンプロモーターの全塩基の約2/3を欠失させ、新たなプロモーターを得る。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 配列番号1記載の塩基配列からなるDNA分子、またはこれと相同性を有し、配列番号2記載のDNAとは相同性を有しないプロモーター活性を有するDNA分子。

【請求項2】 請求項1記載のDNA分子と外来タンパク質をコードする遺伝子とを有する組み換え体。

【請求項3】 組み換え体がウイルスである請求項2記載の組み換え体。

【請求項4】 外来タンパク質がニューカッスル病ウイルス、伝染性ファブリキウス嚢病ウイルス、伝染性喉頭気管炎ウイルス、及びマイコプラズマからなる群より選択される病原体由来のタンパク質である請求項3記載の組み換え体。

【請求項5】 請求項2～4のいずれかに記載の組み換え体を有効成分とするワクチン。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明が属する技術分野】 本発明は、プロモーター活性を有する新規DNA分子とその利用に関する。

【0002】

【従来の技術】 近年、組み換えウイルスなどの組み換え体を、生体に直接接種する生ワクチンタイプの使用が検討されている（特開平6-078764号公報など）。こうした組み換えウイルスをワクチンとして用いる場合、一つのウイルス（以下、親ウイルスということがある）に複数の病原ウイルス由来の抗原遺伝子を挿入して多価組み換え体を得、これを多価ワクチンに用いることが可能である（特開平9-00979号公報など）。しかし、実際にはこうした多価組み換え体のワクチンは実用化されていない。これは、組織培養、14巻、4号、107～111頁、1988年発行や特開平10-327871号公報などで指摘されているように、一つのウイルスゲノム内に複数の抗原遺伝子を挿入されて肥大化したゲノムを持った多価組み換え体である組み換えウイルスは増殖性が低下したり、挿入した遺伝子が脱落する、といった問題をもつことに起因している。通常、親ウイルスゲノムに対して挿入できる遺伝子は数%であるとされている。そこでゲノムの肥大化を抑えるため、親ウイルスゲノムの非必須な領域を削除し、そこに抗原遺伝子などを挿入する方法が広く用いられているが、このほか挿入する遺伝子を短くする方法も考えられている。

【0003】 組み換え体には、抗原遺伝子の他にプロモーターなどの機能遺伝子を挿入するのが一般的である。プロモーターは通常、一つの抗原遺伝子に一つ必要であるため、挿入される抗原遺伝子の数が増えれば、挿入されるプロモーターの数も増える。従って親ウイルスゲノムの肥大化を防止するためにも、挿入するプロモーターを短くする必要が生じている。

【0004】 ところで、プロモーターの下流領域には、

イントロンと呼ばれる領域を持つものがある。一般に、イントロン領域があることでプロモーターの活性が高まると言われている（Gross, M. K., Kainz, M. S. and Merrill, G. F. (1987) Mol. Cell. Biol. 7, 4576-7, Buchman, A. R. and Berg, P. (1988) Mol. Cell. Biol. 8, 4395-7, Evans, M. J. and Scarpulla, R. C. (1989) Gene 84, 135-7, Huang, M. T. F. and Gorman, C. M. (1990) Nucl. Acids Res. 18, 937-7,)。

【0005】 高発現プロモーターとして知られている鶏由来の β -アクチンプロモーターの全長は約1.5kbと長い（Kost, T. A., Theodorakis, N. and Hughes, S. H. (1983) The nucleotide sequence of the chick cytoplasmic beta-actin gene. Nucleic Acids Research 11: 8287-301）。この鶏由来の β -アクチンプロモーターの発現量をさらに高める目的で、このプロモーターにスライシングアクセプター配列やエンハンサー配列などをプロモーターに付加することが提案されている（特開平2-156891号公報、特開平3-168081号公報、特開平7-298877号公報など）。しかしながら、こうした高発現プロモーター研究の流れは、上述した挿入遺伝子をより短くするという多価組み換え体構築の要請に合致しない。

【0006】

【発明が解決しようとする課題】 かかる従来技術のものと、全長が短い高発現プロモーターを得るべく鋭意研究した結果、本発明者らは、これまで高発現化に有効といわれてきたイントロン部分を欠いても鶏由来の β -アクチンプロモーターが高発現を実現できることを見だし本発明を完成するに至った。

【0007】

【課題を解決するための手段】 かくして本発明によれば、配列番号1記載の塩基配列からなるDNA分子、またはこれと相同性を有し、配列番号2記載のDNAとは相同性を有しないプロモーター活性を有するDNA分子（以下、これらをまとめて、本発明のプロモーターということがある）が提供され、また当該DNA分子と外来タンパク質をコードする遺伝子とを有する組み換え体が提供され、さらに当該組み換え体を有効成分とするワクチンが提供される。

【0008】

【発明の実施の態様】 以下に、本発明を詳述する。

(1) DNA分子

本発明のDNA分子は、配列番号1記載の塩基配列を有

し、またはこれと相同性を有し、配列番号2記載の塩基配列と相同性を有さないものである。また、本発明のDNA分子はプロモーター活性を有する。配列番号1記載の塩基配列は、鶏由来の β -アクチンプロモーターの5'側に存在する塩基配列との相同性が高く、配列番号2記載の塩基配列は、鶏由来の β -アクチンプロモーターの3'末端寄りに存在するイントロン中の配列と相同性が高い。従って、配列番号2記載の塩基配列と相同性を有さない本発明のDNA断片は、公知の β -アクチンプロモーターとは異なるプロモーターである。

【0009】本発明のDNA分子として、配列番号1記載の塩基配列を有するDNA分子や配列番号3記載の塩基配列を有するDNA分子などが挙げられる。配列番号1記載のDNA分子は、DNA合成などにより得ることができるほか、 β -アクチンプロモーター（以下、単にアクチンプロモーターということがある）の3'末端側から650bp以上を削除して得ることもできる。アクチンプロモーターの具体例として、鶏由来の配列番号4記載の塩基配列からなるDNA分子が挙げられる。

【0010】配列番号3記載のDNA分子は、DNA合成などにより得ることができるほか、配列番号1記載のDNA分子の5'側に、サイトメガロウイルス（以下CMVと言うことがある）のIEプロモーター（以下、単にCMVプロモーターということがある。Boshart, M.ら(1985)Cell 41, 521-）の一部を付加することによって得ることもできる。

【0011】また、本発明のDNA分子は、少なくとも配列番号1記載の塩基配列からなるDNA分子と相同性を有し、配列番号2記載の塩基配列と相同性を有さず、配列番号1記載のDNA分子と同等またはそれ以上のプロモーター活性を有する限り、常法によって塩基が置換、欠損、または付加されたものであってもよい（その例が配列番号3記載のDNA分子である）。プロモーターとしての機能を十分に発揮させる点からDNA分子の全長は、120~850bp、好ましくは150~600bp、特に好ましくは150~350bpである。

【0012】また、TATAAAで表される塩基配列は転写開始のシグナル領域であり、本発明のプロモーターに必須であるので、たとえば配列番号1記載のDNA分子を修飾する場合でもこの領域を変更することはできない。この部分塩基配列の最も5'側の塩基T（チミン）より3'末端側の塩基の数の上限が、200bp、好ましくは180bp、より好ましくは150bp、特に好ましくは120bpであり、下限は30bp、好ましくは50bpである場合、特に優れたプロモーター活性を示す。

【0013】本発明において「相同性を有する」とは、Lipman and Pearson (Science, 227, 1435- (1985) のアルゴリズムを利用した配列データベースソフト「DNASIS」(販

売元：宝酒造社、製造元：Hitachi Software Engineering社)によって算出されたスコアが200以上あることをいう。本発明において「相同性を有しない」とは同ソフトで算出されたスコアが100以下であることをいう。

【0014】本発明において「プロモーター活性」とは、当該DNA分子の下流にある遺伝子の発現を促す活性であり、その測定方法はプロモーターと思われるDNA領域の下流にルシフェラーゼ遺伝子などのマーカー遺伝子を挿入した組み換え体を作成し、マーカー遺伝子産物の発現量を測定する一般的な方法でよい。

【0015】より具体的には、以下の手順が例示される。プロモーター活性を測定したいDNA配列の下流にマーカー遺伝子を挿入したプラスミドベクターを作製する。このマーカー遺伝子としてはサンプルの調製および測定の容易さからルシフェラーゼ遺伝子が好ましい。このプラスミドは他の領域に同じマーカー遺伝子を含まないものであれば特に限定されるものではなく、後述する組み換え体の説明で例示されるものと同じものが使用できる。

【0016】この組み換えプラスミドを用いて組み換えベクターは常法に従って作製される。作製されたベクターは細胞内に導入される。ここで用いられる細胞は、プロモーターが転写され、マーカー酵素の測定に影響を与える物質、ルシフェラーゼを例に取れば発光基質、発光酵素などを含まない細胞であればよい。

【0017】このように遺伝子導入した細胞を一定時間培養した後、マーカー遺伝子によって発現されたタンパク質を抽出、回収する。培養時間は、マーカー遺伝子によって任意に設定できる。ルシフェラーゼの場合は10時間後から5日以内であり、好ましくは18時間後から3日以内で、より好ましくは約24時間後である。培養時間はあまり短いとプロモーターの活性が完全に現れる前であり、長すぎると発現したタンパク質が分解され、プロモーターの活性が正しく測定できない。

【0018】回収されたマーカー遺伝子産物の活性を測定し、培養量あたりのマーカー遺伝子産物量を算出し、一定細胞あたりのプロモーターの量を換算する。マーカー遺伝子としてルシフェラーゼを使用する場合、発現量の測定にはルミノメーターを用いるのがよい。既知濃度のルシフェラーゼをまず測定し、ルシフェラーゼ量とルミノメーターより読みとれる数値の換算の標準直線を求める。この標準線より、ルシフェラーゼの量を換算することによって、プロモーター強度を測定することができる。

【0019】(2) 組み換え体

本発明の組み換え体は、上述した本発明のプロモーターとその下流に外来性のタンパク質をコードする遺伝子（以下、外来遺伝子という）とを有するものである。本

発明において組み換え体は、組み換えウイルスや組み換えプラスミドなどの組み換えベクターである。組み換えウイルスは特に限定されるものではないが、真核生物の核内でDNA複製がおこるものが望ましい。具体例としては、組み換えウイルスとしては、組み換えアデノウイルスや組み換えヘルペスウイルスが好ましく、特に組み換え七面鳥ヘルペスウイルスや組み換えマレック病ウイルスなどの組み換えヘルペスウイルスが好ましい。

【0020】組み換えウイルスは、例えば、以下のように調製される。ベクターにクローニングされたウイルスゲノムの非必須領域に、当該ウイルス内で機能するプロモーターとともに他の病原体の抗原遺伝子を組み込む。ウイルス感染細胞に該ベクターを導入することにより、相同組み換えを起こさせ、その結果生じた組み換えウイルスを選択、純化する。ここで非必須領域は、外来遺伝子が挿入されても生体内での増殖低下が起こらないか、低下が少ないゲノム領域を選択するのが望ましい。

【0021】組み換えウイルスをワクチンとして用いる場合、組み込む外来遺伝子として抗原遺伝子を用いる。具体的な作製方法は以下の通りである。すなわち、あらかじめウイルスを感染させた細胞に、例えば、リン酸カルシウム共沈法、電気穿孔法、遺伝子銃による挿入、リポフェクション法等により組み換えベクターが導入することで、ベクターと感染細胞中のウイルスゲノムDNAとの間で相同組み換えが起こらせ、組み換えウイルスが構築される。または、感染性のあるウイルスゲノムDNAとともに組み換えベクターを上記方法で細胞に導入することによっても組み換えウイルスを構築することができる。

【0022】得られた組み換えウイルスを、イーグルMEMなどの培地で培養された宿主細胞に感染させ、組み込んだ抗原遺伝子をプローブとするハイブリダイゼーション法や、抗原遺伝子と共に組み込んだマーカー遺伝子の発現等の方法により、生育してくるブラークの中から候補株を純化する。候補株が目的の組み換えウイルスであることは、組み込んだ抗原遺伝子のコードするポリペプチドに対する抗体を使用したイムノアッセイ等の方法により確認できる。例えば、マーカー遺伝子としてlacZ遺伝子が組み込まれている組み換えウイルスの場合、 β -ガラクトシダーゼを発現する。よって、その基質の1つであるBlue-gal (GIBCO-BRL社製) 存在下で青いブラークを形成するので、その性質を利用して選択、純化することができる。宿主細胞としては、用いるウイルスが感染し、増殖することが可能なものであれば特に限定されず、例えば、組み換え七面鳥ヘルペスウイルスを用いた場合は、CEF細胞や、発育鶏卵しょう尿膜細胞等が挙げられる。

【0023】(ウイルス) 組み換えウイルスを作製するために用いるウイルス(親ウイルス)は、真核生物の核内で増殖するいかなるウイルスでもよいが、鶏、七面

鳥、アヒルなどの家禽類の細胞中で増殖可能な、例えばトリアデノウイルスや、七面鳥ヘルペスウイルス(以下、HVTということがある)、マレック病ウイルス(以下、MDVということがある)、伝染性咽頭気管炎ウイルス(以下、ILTVということがある)などのヘルペスウイルスが例示される。

【0024】ヘルペスウイルスの具体例としては、HVTではFC126(ATCC VR-584B)、PB-THV1、H-2、YT-7、WTHV-1、HPRS-26などが挙げられ、例えば、FC126株を好適に使用することができる。また、MDVとしては、具体的にはCVI988やSB1などが挙げられる。ここに例示されたウイルスは、寄託機関、市販ワクチンとしてあるいはアメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション(ATCC)などの機関から入手できる。

【0025】(非必須領域を含有するベクター) 組み換え用ベクターの構築に用いられるウイルスの非必須領域をクローニングするためのベクターは、特に限定されない。例えば、pBR322、pBR325、pUC7、pUC8、pUC18等のプラスミド、 λ ファージ、M13ファージなどのファージ、pHC79等のコスミドなどのベクターを適当な制限酵素で処理して、ウイルスの非必須領域を組み込めばよい。

【0026】(非必須領域) ウイルスの非必須領域は、親ウイルスゲノムと相同組み換えを起こしうる領域であって、親ウイルスの増殖に非必須な領域であれば特に制限されない。こうした非必須領域は、公知のものをを用いることができ、例えばWO99/18215号公報に記載された遺伝子間領域などを利用することもできる。より具体的に好ましい非必須領域としては、七面鳥ヘルペスウイルスのUL45遺伝子とUL46遺伝子間が挙げられる。

【0027】(抗原遺伝子) 抗原遺伝子は、組み換えウイルスが感染細胞中で、転写、翻訳し抗原タンパク質として発現しうるものであればよく、例えば、ニューカッスル病ウイルス(以下、NDVということがある)のHNタンパク質をコードする遺伝子(Millerら、J. Gen. Virol., 67, 1917-1927(1986))、Fタンパク質をコードする遺伝子(McGinnesら、Virus Res., 5, 343-356(1986))、MDVの糖タンパク質gBをコードする遺伝子(Rossら、J. Gen. Virol., 70, 1789-1804(1988))、伝染性ファブリキウス嚢病ウイルス(以下、IBDVということがある)の構造タンパクVP2をコードする遺伝子(Baylissら、J. Gen. Virol., 71, 1303-1312(1990))、マイコプラズマ(以下、MGということがある)のアドヘシタンパク質、HMW関連タンパク質、40Kタンパク質(WO93/24646号公報)、66Kタンパク質、67K

タンパク質など(WO97/03187号公報)、伝染性喉頭気管炎ウイルスのgBタンパク質(Poulse nら、Virus Genes、5、335-347 (1991)、USP5、443、831)、UL32タンパク質(WO98/07866号公報)等の感染防御に關与した抗原をコードした遺伝子が好ましい。

【0028】また、これら抗原遺伝子のうち、特にIBDVのVP2タンパク質などは株間によって変異が激しいことが知られているが、挿入される遺伝子は株によって特定されるものではなく、日本の超強毒株である、岡山株、愛媛株、徳島株、ヨーロッパの超強毒株であるUK661、アメリカの強毒株であるSTC株やVirulent株など由来のVP2遺伝子(Yamaguchi T.ら、Arch Virol.、142、1441-1458 (1997))を例示することができる。

【0029】(組み換え用ベクター)本発明で用いる組み換え用ベクターは、非必須領域に抗原遺伝子とそれを支配するプロモーターが挿入されたものである。前述の非必須領域中に前述の抗原遺伝子及びそれを支配する本発明のプロモーターを挿入すればよい。さらに、組み換えウイルスの純化などの効率化のために大腸菌由来のlacZ遺伝子などのマーカー遺伝子をプロモーターとともに組み込んでもよい。

【0030】(プロモーター)本発明で用いるプロモーターは、上述した本発明のプロモーターである。このプロモーターは上述した外来遺伝子の発現を支配するようにウイルスゲノム中で、プロモーターの下流に抗原遺伝子が位置するように挿入される。マーカーを挿入する場合、マーカーの発現を支配するプロモーターを用いる。ここで用いるプロモーターは特に制限されず、組み換えウイルス感染宿主中でプロモーターとして機能するものであればよい。

【0031】(エンハンサー)さらに、本発明の組み換え体には、請求項1記載のプロモーターにエンハンサー配列を入れると発現量を高めることができる場合がある。本発明のプロモーターは全長が短いので、エンハンサーを含ませても遺伝子の脱落が生じにくい。エンハンサーは公知のものを用いることができるが、具体例としては、サイトメガロウイルス由来のIEプロモーターの一部などが例示される。

【0032】(3)ワクチン

本発明を利用する生ワクチンは、上述した本発明の組み換え体を1種類以上含有し、これが有効成分となっているワクチンである。即ち、本発明の組み換え体、好ましくは組み換えウイルスを単独、または2種類以上混合または併用して用いることができる。さらにこのほか、本発明のワクチンと他のワクチンとを組み合わせてもよい。ここで、組み合わせ可能な他のワクチンとしては、たとえば特開平2-157381号公報や特開平3-2

7284号公報記載の抗NDVワクチンとなる組み換えアビボックスウイルスや特開平6-78764号公報や米国特許出願第08/499,474号明細書に記載されている抗MDVワクチンとなる組み換えアビボックスウイルスなどの組み換えワクチン、抗MDVワクチンとして用いられる七面鳥ヘルペスウイルスワクチンなどが例示される。また、組み換え体以外にも薬理学的に問題のないキャリアー、例えば生理食塩水、安定剤などを含んでいてもよい。

【0033】本ワクチンの調製法は、組み換えウイルスを用いる場合、その感染細胞を当該ウイルスが生育できる細胞(以下、宿主細胞という)に感染させ、ウイルスを増殖させた後、感染細胞を回収し、ウイルスをワクチンとして調製する。HVTの生ワクチンの場合を例にとって説明する。宿主細胞としては、トリ由来の細胞が好ましく、ニワトリ胚繊維芽細胞(CEF)、ニワトリ腎細胞などを好適に使用することができる。このような宿主細胞に感染させ、ウイルスを増殖させた後、細胞をスクレーパーまたはトリプシンではがし、遠心分離によって感染細胞と上清とに分離する。得られた感染細胞は、10%のジメチルスルフォキシド(DMSO)を含む培養用培地に懸濁し、液体窒素存在下で凍結保存する。ワクチンとして使用するときは100倍量のリン酸緩衝液にこの凍結保存品を溶かして使用する。

【0034】液体窒素下で上記感染細胞を保存するための安定剤やその他の成分は、ウイルス感染細胞が安定に生存でき、かつレシピエントにとって薬理学的に問題のない成分であれば特に限定されない。

【0035】本発明のワクチンの投与方法は特に限定されない。HVTの生ワクチンの場合には皮下に注射により接種する方法が一般的に用いられており、現行のHVTワクチンと同じである。接種量も従来ワクチンと同様でよく、 $10 \sim 10^5$ TCID₅₀を接種、好ましくは初日齢に鶏の背部皮下における 10^3 TCID₅₀接種である。

【0036】

【実施例】以下に実施例を挙げて本発明を説明するが、本発明はこれに限定されるものではない。

【0037】(実施例1)高活性Pecプロモーターの構築と活性測定

1-1 末端切り縮め β -アクチンプロモーター

WO99/18215号公報に記載された、pUC18のマルチクローニングサイトにpolyA付加シグナルとSfiIサイトを導入したプラスミドpGIMICS-polyASfi(全長2773bp)を制限酵素NheIで処理して得られた断片と、Picagene Enhancer2(全長5064bp。東洋インキ社製)をNheI及びXbaIで切り出して得られた1721bpとを連結し、プラスミドpLUC-pro(全長4494bp)を作製した。

【0038】次に、ニワトリのゲノムバンクを作製し、これをテンプレートとして、配列番号8記載のプライマーPrBac1 (5'-CAGTGTCTGCTGCAGCTCAGTGCATGCACGCTCATTTGCC-3')及び配列番号9記載のプライマーPrBac2 (5'-GCTCTAGAGTCGACAAAGCTTTCATGGCTGGCTGCGGAGGAACAGAGAAGGG-3')を用いてPCRにより β -アクトチンプロモーターを含むDNA断片(約1.5Kbp)を得た。

【0039】この断片をPstIとXbaIで処理して得られた約1.5KbpのDNA断片と、pLUC-proをPstIおよびXbaIで処理して得られた4482bpのDNA断片とを連結して、 β -アクトチンプロモーター領域を含むpLUC-bac (5986bp)を作製した。

【0040】得られたpLUC-bacをBamHIとBglIIで処理した後、5958bpの断片を回収、ライゲーションしてpLUC-bac-Smaを作製した。このpLUC-bac-Smaを、5'側の切り縮めにはPstIとSmaI、3'末端側にはSacIとXbaIを用いて処理した。引き続き、得られたDNA断片をKilo-Sequence用Deletion Kit (Takara社製)を用いて、ExoIIIと3分間反応させ、1分おきにサンプルを分取し、約200bp~約1500bpのプロモーター断片を含むプラスミドを多数取得した。

【0041】ルシフェラーゼ活性測定は、東洋インキ製造株式会社(販売元:和光純薬)の「ピッカジーン」を用いた。まず、これらのプラスミド29個について各1 μ gを、 2×10^6 個の細胞に、0.4cmギャップのキュベットを用いて、室温でジーンバルサー(Bio-Rad社)を用いて1.2kV、0.4msecの条件にて遺伝子を導入した。約24時間培養した後、培養液を捨て、細胞融解液を加えた後、-80℃で1時間凍結し、細胞を完全に融解した。得られた液体を遠心分離して得られた上澄み活性測定用のサンプルとした。100 μ lずつ分注した前述記載のKit添付の基質液に、10 μ lのサンプルを加え、1分後にルミノメータ(型番「model11253」、Bio-Rad社製)を用いて、発光の強さ(単位:RLU)からルシフェラーゼ生産量を算出し、プロモーター活性を調べた(図1参照)。

【0042】全長 β -アクトチンプロモーターのルシフェラーゼ生産量を1とすると、5'側の切り縮めサンプルは図1のように、TATAAAの配列より5'側が120bp以上欠損しているものの活性が急激に低下した。一方、切り縮めた長さとは活性には相関がなく、約850bp切り縮めたときの活性が最も高く、逆に100bp足らずの切り縮めサンプルでは活性が全長の0.2倍に

とどまった。

【0043】1-2 コアシーケンスプロモーターpLUC-bacの β -アクトチンプロモーターを鋳型として、配列番号10記載の5'-TATTTTGTGCAGCGAT-3'、配列番号11記載の5'-ACGTCTAGAAGGCAACGCAGCGACT-3'及び配列番号13記載の5'-CTGTCTAGATAACGCGGTCAAGTCAGA-3'をプライマーとしたPCRを行ったところ、273bp、211bpの他、175bp、163bpの長さの断片も得られた。得られたDNA断片をコアシーケンスプロモーター(COA)と名付けた。これらのCOAを、PstI及びXbaIで処理して得られたDNA断片と、pLUC-proをPstI及びXbaIで処理して得られた約4482bpの断片とをライゲーションしてプラスミドを得た。得られたプラスミドをそれぞれpULC-COA273、pLUC-COA211、pULC-COA175、pLUC-COA163と銘付した。得られたプラスミドを用いてプロモーターの活性を、前記1-1の方法と同様にして測定したところ、全長 β -アクトチンプロモーターのルシフェラーゼ生産量を1とすると273bpで0.97、211bpで0.76、175bpで0.96、163bpで0.34となった。

【0044】1-3 エンハンサー領域の付加
配列番号5記載のCMV由来(590bp)のエンハンサー、配列番号6記載のRSV由来のエンハンサー(90bp)は、プラスミドpLUC-COA273中のプロモーターより上流に位置するPstIサイトに挿入した。これらは、プラスミドへの挿入のために、5'側にはCTGCAGの6塩基を、3'末端側にはGAATTCの6塩基が付加されている。配列番号7記載のSV40由来のエンハンサー(200bp)を、プラスミドpLUC-COA273のルシフェラーゼ遺伝子より下流側に位置するEcoRIサイトに挿入した。これらエンハンサー付加プラスミドについて、上述と同様の方法によりルシフェラーゼ生産量で求められるプロモーター活性を測定したところ、RSVエンハンサーを有するプラスミドでは1.4倍、SV40を有するプラスミドでは3.6倍に活性が上昇することが確認された(図2参照)。また、CMVエンハンサーについては、切り縮めたDNA断片を用意した。具体的には、配列番号5記載の第7番目~第370番目、同配列の第7番目~第282番目、同配列の第7番目~第159番目、同配列の第7番目~第89番目、同配列の第93番目~第370番目、同配列の第93番目~第282番目、第93番目~第159番目のDNA断片を用意し、これらの断片を、プラスミドpLUC-COA273中のプロモーターより上流に位置するPstIサイトに挿入しプロモーター活性への影響を確認した。その結果、挿入する領域によって活性促進の効果が異なっていたが、配列番号5記載

の第7～282番目の275bpを付加した場合にプロモーター活性が6.5倍と最も高い活性を示した。

【0045】この最も高い活性が得られたプラスミドには、CMV275bpエンハンサーとコアシークエンス273bpプロモーターとからなるキメラDNA領域が含まれている。このエンハンサーとプロモーターとからなるキメラDNA領域(Pec(+))のサイズは557bpである。また、このキメラDNA領域中、5'側にあるBglIサイト(GCCCGCCTGGC)からTを、3'末端側にあるBglIサイト(GCCCATTTGGC)のAとTの間のCを欠失させた555bpのキメラDNA領域を含むプラスミドpLUC-Pec(全長5037bp)も作成した。いずれのプラスミドにおいても、従来組み換えHVTの外來遺伝子用プロモーターであるRSVやCMVプロモーターの数倍以上の活性を示した(図3参照)。

【0046】(実施例2)組み換えベクターの構築

2-1 IBDV用組み換えベクターpNZ45/46Pec(+)-VP2Sの構築
新規合成プロモーターPec(+)でIBDVのVP2を発現させる組み換えベクターpNZ45/46PEC(+)-VP2Sを、以下の手順で構築した。pGIMC SpolyASfiを制限酵素BglIで処理して得られた120bpのマルチクローニングサイトを含むDNA断片を、制限酵素SfiIで処理したpNZ45/46Sfi(全長5486bp、WO99/18215号公報)に挿入し、pNZ45/46MCSpolyA(全長5606bp)を作製した。次に、制限酵素PstIおよびXbaIで切り出したプロモーターPec(+)-領域を含むDNA断片(561bp)とpNZ45/46MCSpolyAを制限酵素PstIおよびHindIIIまたはHindIIIおよびXbaIで処理したDNA断片(それぞれ3617bp、1977bp)の3断片をライゲーションによってpNZ45/46Pec(+)-MCSpolyA(全長6155bp)を構築した。

【0047】IBDV超強毒株である岡山株よりcDNAを合成して、PCRにより、pUC19SmaI部位にクローニングした3つの断片(Virol.223, 219-223, 1996)を岐阜大学より入手した。これら3つの断片をClaI、SpeI、BamHIを用いて接続して、SegmentA全長約3.2Kbpを持つpUC19SegA-OKYMを作製した。このpUC18SegA-OKYMをテンプレートとして、配列番号13記載のプライマーPrVP2-2(5'-GCGGATCCCCCGCAGCGATGACGAACCTGC-3')及び配列番号14記載のプライマーPrVP2-3(5'-GCGTCGACTCACCTCCTTAGGGCCC-3')を用いたPCRにより、VP2のみを含有するDNA断片を得た。

【0048】このPCR断片を制限酵素BamHIおよびSalIで切り出したIBDVのVP2S遺伝子を、pNZ45/46Pec(+)-MCSpolyAを制限酵素BamHIおよびSalIで処理したDNA断片(6113bp)にライゲーションによって挿入し、pNZ45/46Pec(+)-VP2S(OKYM)(全長7490bp)を構築した。

【0049】2-2 NDV用組み換えベクターpNZ45/46PecFHNの構築

10 新規合成プロモーターPecでNDVのFおよびHN遺伝子を発現させるトランスファーベクターpNZ45/46PecFHNを以下の手順で構築した。pLUC-Pecから制限酵素PstIおよびXbaIで切り出したPec領域を含むDNA断片(559bp)と、pGIMC SpolyASfiを制限酵素PstIおよびXbaIで処理して得られたDNA断片(2761bp)と連結し、pGIPEC(全長3320bp)を作製した。

【0050】XLIII10H(Virus Research, 7, 241-255(1987))をテンプレートとして、配列番号15記載のプライマーPrF1(5'-GCTCTAGAGGATCCGCATGGGCTCCAGATCTTCTACCAGGATCCC-3')及び配列番号16記載のプライマーPrF2(5'-GCGAGCTCGGTCCATGACTGAGACTGCTATTGG-3')を用いて、PCRを行いF遺伝子を含むDNA断片を得た。このDNA断片を制限酵素SacIおよびXbaIで切り出したNDVのF遺伝子を含む領域(1889bp)を同じ制限酵素処理をしたpGIPECにライゲーションによって挿入し、pGIPECF(全長5191bp)を作製した。

【0051】同様に、XLIII10Hをテンプレートとして、配列番号17記載のプライマーPrHN1(5'-GCGGATCCTCTTTCAGTCATGGACCGCGCAGTTAGCCAAGTTGCGC-3')及び配列番号18記載のプライマーPrHN2(5'-GCGGTACCGCATGCGGGCCCCGCTAGCGAGCTCGCGCCGGTACTCAGTTTGATTCTTGGCG-3')を用いて、PCRを行い、HN遺伝子を含むDNA断片を得た。このDNA断片をBamHIとKpnIで処理し(1842bp)、同じ制限酵素処理をしたpGIPECにライゲーションによって挿入し、pGIPEC HN(全長5123bp)を作製した。

【0052】pGIPECFのプロモーターおよび抗原遺伝子領域を制限酵素BglIによって切り出し(2538bp)、pNZ45/46Sfi(全長5486bp)の制限酵素SfiIに挿入することによって、pNZ45/46PecF(全長8024bp)を構築し、

13

次にpGIPecHNのプロモーターおよび抗原遺伝子領域を制限酵素BglIによって切り出し(2470bp)、pNZ45/46PecFの制限酵素SfiIに挿入することによって、pNZ45/46PecFHN(全長10494bp)を構築した。

【0053】2-3 MG用組み換えベクターpNZ45/46Pec40KS

新規合成プロモーターPecでMGの40K遺伝子を発現させるトランスファーベクターpNZ45/46Pec40KSを、以下の手順で構築した。pGTPs40K-S(WO97/36924、全長3967bp)より制限酵素BamHIおよびSalIで切り出したMGの40Kを含む領域(1344bp)を同じ制限酵素処理をしたpGIPecにライゲーションによって挿入し、pGIPec40KS(全長4622bp)を作製した。pGIPec40KSのプロモーターおよび抗原遺伝子領域を制限酵素BglIによって切り出し(1967bp)、pNZ45/46SfiI(全長5493bp)の制限酵素SfiIに挿入することによって、pNZ45/46Pec40KS(全長11405bp)を構築した。

【0054】2-4 ILTV用組み換えベクターpNZ45/46PecILUL32gB

新規合成プロモーターPecでILTVのUL32およびgB遺伝子を発現させるトランスファーベクターpNZ45/46PecILUL32gBを、以下の手順で構築した。WO98/07866号公報記載のpGTPsILUL32(全長4383bp)より制限酵素BamHIおよびSalIで切り出したILTVのUL32遺伝子を含む領域(1760bp)、およびWO98/07866号公報記載のpGTPsILgB(BglI-) (全長5307bp)より制限酵素BamHIおよびKpnIで切り出したgB遺伝子を含む領域2648bpをそれぞれ挿入領域を切り出した制限酵素と同じ制限酵素処理をしたpGIPecにライゲーションによって挿入し、pGIPecILUL32(全長5038bp)、およびpGIPecILgB(全長5918bp)を作製した。pGIPecILUL32のプロモーターおよび抗原遺伝子領域を制限酵素BglIによって切り出し(2385bp)、これをpNZ45/46SfiI(全長5493bp)の制限酵素SfiIに挿入することによって、pNZ45/46PecILUL32(全長7878bp)を構築し、次にpGIPecILgBのプロモーターおよび抗原遺伝子領域を制限酵素BglIによって切り出し(3265bp)、これをpNZ45/46PecFの制限酵素SfiIに挿入することによって、pNZ45/46PecILUL32gB(全長11143bp)を構築した。

【0055】(実施例3)組み換えウイルスの構築純化
実施例2に記載のプラスミドについて、以下のブラック

14

ブランク法を用いた純化法によって、組み換えHVTの構築・純化を行った。まず、Morganらの方法(AVIAN DISEASES、34:345-351(1990))によって、野生型HVT(以下wtHVT)のDNAの調製を行った。組み換えベクターは、骨格領域にユニークに存在する制限酵素サイトを利用して直鎖状に加工した。

【0056】遺伝子導入は電気穿孔法を用い、具体的には以下の方法で行った。組み換えベクターDNA 5μgおよび25μgのHVT-DNAを100μlのSalineG(0.14M塩化ナトリウム、0.5mM塩化カリウム、1.1mMリン酸一水素二ナトリウム、1.5mMリン酸二水素一ナトリウム0.5mM塩化マグネシウム・6水和物、0.011%グルコース)に懸濁した。2×10⁶コのニワトリ胚繊維芽細胞(CEF)を0.7mlのSalineGに懸濁し、上記DNA液を加え、室温でジーンパルサー(Bio-Rad社製)を用いて1.2kV、0.4msecの条件にて遺伝子導入した。細胞を室温で10分間静置した後、4%牛血清を含むLeibovitz's L-15、McCoy's 5A Medium(ともにGIBCO BRL社製)(以下、LM(+)と言う)を加え、6cm径の細胞培養用ディッシュ(Falcon社)で、37℃、5% CO₂インキュベーター中で6日、培養した。この細胞を適当に希釈し、LM(+)に懸濁したCEFと混ぜ、96well plate(Falcon)に分注し、ブランクがでるまで培養した。各プレートから2枚ずつレプリカのプレートを作製し、同様にブランクがでるまで培養した。そのうちの1枚をメタノールで固定し、挿入遺伝子に対するウサギ抗体を1次抗体とした抗原抗体反応により、組み換えHVTが存在しているかどうかの確認を行った。組み換えHVTの確認されたwellに相当するレプリカより細胞を回収、希釈し、LM(+)に懸濁したCEFとまぜて96well plateに分注し、培養した。この、希釈・レプリカの作製・組み換えHVTの確認の繰り返しを、1wellから由来するブランクがほぼ100%組み換えHVTであることを確認できるまで行った。この組み換えHVTを10⁵pfu程度までCEFで増殖後、超音波破碎処理を行い、遠心上清を、96well plateに新たに調製したCEFに感染させた。再び、希釈・レプリカの作製を、組み換えHVTが100%になるまで繰り返した。

【0057】組み換えベクターpNZ45/46Pec(+)-VP2S(OKYM)を用いた場合、抗VP2タンパク質ウサギ抗体を用いたBPA法による純化によって、組み換えHVT;HF016(以下、HF-PecVP2と言うことがある)を作製した。また、組み換えベクターpNZ45/46PecFHNを用いた場合、抗NDVウサギ抗体を用いたBPA法による純化によ

て、組み換えHVT；HF018（以下、HF-Pec HNFと言うことがある）を作製した。同様に、組み換えベクターpNZ45/46PecMGを用いた場合、抗MG40Kタンパク質ウサギ抗体を用いたBPA法による純化によって、組み換えHVT；HF-Pec40KSを、組み換えベクターpNZ45/46PecILUL32gBを用いた場合、抗gBタンパク質およびUL32タンパク質ウサギ抗体を用いたBPA法による純化によって、組み換えHVT；HF-PecILTを作製した。

【0058】純化の終了したウイルスDNAをMorganらの方法により回収し、制限酵素で処理し、アガロース電気泳動後にナイロン膜に移した。挿入抗原遺伝子を鋳型としたランダムプライマー法でサザンハイブリダイゼーションを行った。その結果、組み換えウイルス中に挿入遺伝子が設計どおり正しく存在することが確認された。

【0059】（実施例4）挿入遺伝子の安定性

挿入遺伝子の安定性を選択なしに5代継代を重ねた組み換えウイルスについて調べた。HF-PecHNFの組み換え体について、継代後のウイルスを用いて、抗NDV抗体を用いたBPA法によって純度の検定を行ったと*

(表 1)

	抗40K	抗UL32	抗gB
w t HVT	—	—	—
HF-Pec40KS	+++	—	—
HF-PecILT	—	+++	+++

+++：全面に強く反応、++：強く反応、+：反応、—：反応無し

【0062】この結果から本発明によるプロモーターによって抗原遺伝子が非常に良く発現していることがわかった。

【0063】（実施例6）鶏感染防御試験

6-1 NDVに対する効果実験

実施例3によって得られた組み換えHVTのワクチン効果を判定するためにワクチン効果実験を実施した。各群10羽以上の市販されている白色レグホン（Dekalb鶏、神奈川養鶏連合会）から生まれた初生鶏に、新規プロモーターの組み換えHVT；HF-PecHNFを接種した。陽性対照群にはNDVの市販生ワクチン（NDV-B1strain日本生物科学研究所）を接種し、陰性対照群は非接種とした。

【0064】初生鶏に、組み換えHVTを鶏の背部皮下※

(表 2)

	チャレンジ時の HI抗体価(2 ⁿ)	発症鶏/ チャレンジ鶏	4日目における 発症率(%)
HF-PecHNF	3.1	3/18	17
市販生ワクチン	3.3	3/12	25
非接種対照群	1.0	未実施	未実施

【0066】なお、初生齢のHI抗体価は2⁹であつ

*ころ、すべてのプラークが継代前と全く同様に陽性であった。また、組み換えに用いた相同領域および挿入遺伝子をプローブとしたサザンハイブリダイゼーションを行ったところ、正しい組み換えが起こっていると得られる理論どおりの大きさの、継代前と同様な位置にバンドを検出することができ、これら挿入遺伝子がウイルス中で安定に存在することを確認した。

【0060】（実施例5）免疫蛍光抗体法による挿入遺伝子発現の確認

10 HF-Pec40KSおよびHF-PecILTについて、免疫蛍光抗体法を行った。それぞれの組み換え体をCEFに感染させ、37℃でプラークが出現するまで培養後、冷アセトンで固定し、抗40Kウサギ抗体または抗UL32、抗gBウサギ抗体を一次抗体として、100から1000倍に希釈して反応させた。これらの培養細胞をさらに蛍光物質（FITC）を結合した抗ウサギイムノグロブリンと反応させ、非特異反応部分を洗い流したのち蛍光励起波長光下で顕微鏡観察した。反応性は表1に示した。

【0061】

【表1】

※に10³TCID₅₀となるように26Gの注射針を使って接種した。陽性対照群に使用した市販のNDV生ワクチンは、7日齢鶏に用法通り点眼接種した。接種4週後に、各群の雛に強毒NDV（Sato株）を10⁴pfuとなるように右大腿部にチャレンジした。チャレンジ後4日目にNDVの発症の有無を観察した。また、NDVウイルスをチャレンジする前に各鶏から採血を行い、各鶏の血清中のNDVに対する赤血球凝集抑制抗体の検出を行った。判定は市販されているNDV赤血球凝集素（日本生物科学研究所）の使用説明書に従った。結果を表2にまとめた。

【0065】

【表2】

50 た。この結果から明らかなように、HF-PecHNF

17

を接種した群ではNDVのチャレンジに対してほぼ完璧なワクチン効果が示された。また、チャレンジ時のHI抗体価も非接種群(<2)と比較して明らかに高い値を示した。これらの結果から明らかなように、本発明による組み換えHVTによる生ワクチンは移行抗体鶏に対しても十分な感染防御を付与できることが示された。

【0067】6-2 鶏ワクチンのIBDVに対する効果実験

実施例3によって得られた組み換えHVTのワクチン効果を判定するためにIBDVに対するワクチン効果実験を実施した。なお、プロモーター配列がCMVであることを除き、実施例2、3とはほぼ同様な手順で作製した組み換えHVTをコントロールとして用いた。各群10羽以上の試験用SPF鶏(LineM:日本生物科学研究所)に、PecプロモーターまたはCMVプロモーターに制御されるVP2遺伝子を発現する組み換えHVTを接種した。陽性対照群にはIBDVの市販のワクチンを接種し、陰性対照群は非接種とした。

* 【表3】
(表 3)

	生存率 (%)	ファブリキウス嚢病変					F嚢体重比 % (av. + SE)
		A	B	C	D	E	
HF-Pec VP2	100	10	0	30	10	10	0.67±0.03
CMV-VP2	100	17	25	42	42	42	0.57±0.03
市販ワクチン	100	0	8	40	40	8	0.61±0.05
非接種対照 群	57	25	25	100	100	100	0.43±0.02

【0071】ファブリキウス嚢体重比について各群間で統計的処理(Mann-Whitney U-test)で有意差検定を実施したところ、CMV-VP2接種群および市販ワクチン接種群は非接種対照群と有意差($p < 0.05$)を示したが、HF-PecVP2接種群はさらに強い有意差($p < 0.01$)を示した。この結果から明らかなように、本発明によるプロモーターを有する組み換えHVTを接種した群では従来のプロモーターを有する組み換えHVTに比較してより効果の良いスコアを示した。また、このスコアは市販ワクチン接種

18

*【0068】試験用SPF鶏が孵化したとき、各組み換えHVTを鶏の背部皮下に 10^4 PFUとなるように26Gの注射針をつかって接種した。陽性対照群に使用した市販のIBDVワクチン(北里研究所)は、16日齢の雛に用法通り点眼接種した。

【0069】生ワクチン接種17日後に、各群の雛に超強毒IBDV(Okayama株)を $1.5 \times 10^{3.8}$ EID₅₀となるように経口でチャレンジした。チャレンジ後約3日までの鶏の生死を観察した。その後生存した鶏を屠殺し、IBDVの発症の有無をファブリキウス嚢の病変形成状態を指標として効果を判定した。ファブリキウス嚢の病変形成状態は、出血(A)、嚢内チーズ様浸出物形成(B)、黄色病変(C)、ゼリー様浸出物形成(D)、水腫(E)の5点で判定した。各病変スコアは、病変を示した鶏羽数で表した。結果は表3に示した。

【0070】

【表3】

(表 3)

よりもより高い感染防御効果を示していることがわかった。

【0072】

【発明の効果】本発明によれば、必要領域が短く高活性かつ安全で安定な新規プロモーターが提供され、そのプロモーターを含む組み換えベクター、および組み換えベクターを利用し創出される組み換えウイルス、組み換えウイルスを主成分とする遺伝子組み換えワクチン、あるいは組み換えDNAワクチンが提供される。

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> NIPPON ZEON Co. Ltd.,

<120> Novel Promoter, Recombinant Thereof, and the Uses Thereof

<130> pec promoter ID01-18

<140>

<141>

<160> 18

<170> Patent In Ver. 2.0

<210> 1

<211> 159

<212> DNA

19

20

<213> chicken
 <400> 1
 ggggcggggc cagggcgggg gcggggcgag gcggagaggt gcggcggcag ccaatcagag 60
 cggcgcgctc cgaaagtctt cttttatggc gaggcggcgg cggcggcgcc cctataaaaa 120
 gcgaagcgcg cggcggggcg gagtcgctgc gttgccttc 159
 <210> 2
 <211> 102
 <212> DNA
 <213> chicken
 <400> 2
 tgtcagggcg cggcgagccg cagccattgc cttttatggt aatcgtcga gagggcgag 60
 ggacttcctt tgtcccaaat ctggcggagc cgaaatctgg ga 102
 <210> 3
 <211> 561
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Description of Artificial Sequence:Pec Promoter
 <400> 3
 agttattaat agtaatcaat tacgggggtca ttagttcata gcccatatat ggagttccgc 60
 gttacataac ttacggtaaa tggcccgccg gctgaccgcc caacgacccc cgccattga 120
 cgtcaataat gacgtatgtt cccatagtaa cgccaatagg gactttccat tgacgtcaat 180
 ggggtggagta ttacggtaa actgcccatt ggagtagcat caagtgtatc atatgccaag 240
 tacgccccct attgacgtca atgacggtaa atggatgcag tattttgtgc agcgatgggg 300
 gcgggggggg gggggggcg cgccaggcgg gcggggcggg ggcgaggggc ggggcggggc 360
 gaggcggaga ggtgcggcg cagccaatca gagcggcggc ctccgaaagt ttctttttat 420
 ggcgagggcg cggcggcgcc ggccctataa aaagcgaagc gcgcggcggg cgggagtcgc 480
 tgcgcgctgc cttcgccccg tgcgccgctc cgccgcggcc tcgcgcggcc cgccccggct 540
 ctgactgacc gcgtctagag g 561
 <210> 4
 <211> 1495
 <212> DNA
 <213> chicken
 <400> 4
 gctgcagctc agtgcattgc cgtcattgc ccatcgctat ccctgcctct cctgctggcg 60
 ctccccggga ggtgacttca aggggaccgc aggaccacct cgggggtggg gggagggtg 120
 cacacggga ccccgctccc cctccccaac aaagcactgt ggaatcaaaa aggggggagg 180
 ggggatggag gggcgctca ccccccgcc ccacaccctc acctcgaggt gagccccacg 240
 ttctgttca ctctcccat ctccccccc tccccacccc caattttgta ttatttttt 300
 ttttaattatt ttgtgcagcg atggggcggg gggggggggg ggcgcgcgcc aggcggggcg 360
 gggcggggcc agggcgggg cgggcgagg cgagaggtg cggcggcagc caatcagagc 420
 ggcgcgctcc gaaagtttcc ttttatggcg aggcggcgcc ggcggcgcc ctataaaaag 480
 cgaagcgcg gcggggcggg agtcgctgcg ttgccttcgc cccgtgcccc gctccgcgcc 540
 gcctcgcgcc gcccgcccc gctctgactg accgcgttac tcccacaggt gagcggggcg 600
 gacggccctt ctctccggg ctgtaattag cgcttggttt aatgacggct cgtttctttt 660
 ctgtggctgc gtgaaagcct taaagggctc cgggagggcc ctttgtgcgg gggggagcgg 720
 ctcggggggt gcgtgcgtgt gtgtgtgcgt ggggagcgcc gcgtgcggcc cgcgctgccc 780
 ggcggctgtg agcgctgcgg gcgcggcgcg gggtttgtg cgctccgcgt gtgcgcgagg 840
 ggagcgggc cggggcggt gcccgcggt gcgggggggc tgcgagggga acaaggctg 900
 cgtcggggt gtgtgcgtgg ggggtgagc aggggtgtg ggcgcggcg tcgggtgta 960

21

22

```

acccccccct gcacccccct ccccagattg ctgagcacgg cccggcttcg ggtgcggggc 1020
tccgtgcggg gcgtggcgcg gggctcgccg tccggggcgg ggggtggcgg cagggtggggg 1080
tgccggggcg ggcggggccg cctcggggcg gggagggctc gggggagggg cgcggcgggc 1140
ccggagcgcc ggcggctgtc gagcgcgggc gagccgcagc cattgccttt tatggtaatc 1200
gtgcgagagg gcgcaggggc ttctttgtc ccaaatctgg cggagccgaa atctgggagg 1260
cgccgcccga cccctctag cgggcgcggg cgaagcgggt cggcgccggc aggaaggaaa 1320
tgggccccga gggccttcgt gcgtcgccgc gccgccgtcc ctttctccat ctccagcctc 1380
ggggctgcgg cgggggaccg ctgccttcgg gggggcgggg cagggcgggg ttccgcttct 1440
ggcgtgtgac cggcgggggt tatactctcc ctctctgtt cctccgcagc cagcc 1495

```

<210> 5

<211> 599

<212> DNA

<213> cytomegalovirus

<400> 5

```

ctgcagagtt attaatagta atcaattacg gggtcattag ttcatagccc atatatggag 60
ttccgcgtta cataacttac ggtaaatggc ccgcctggct gaccgcccga cgacccccgc 120
ccattgacgt caataatgac gtatgttccc atagtaacgc caatagggac ttccattga 180
cgtcaatggg tggagtattt acggtaaaact gccacttgg cagtacatca agtgtatcat 240
atgccaagta cgccccctat tgacgtcaat gacggtaaat ggccgcctg gcattatgcc 300
cagtacatga ctttatggga ctttcctact tggcagtaca tctacgtatt agtcatcgct 360
attaccatgg tgatgcgggt ttggcagtag atcaatgggc gtggatagcg gtttgactca 420
cggggatttc caagtcacca cccattgac gtcaatggga gttgttttg gcacaaaaat 480
caacgggact ttccaaaatg tcgtaacaac tccgccccat tgacgcaaat gggcggtagg 540
cgtgtacggt gggaggctta tataagcaga gctgggttag tgaaccgtca gatatgcat 599

```

<210> 6

<211> 101

<212> DNA

<213> Rous sarcoma virus

<400> 6

```

ctgcagaatt ccgcattgca gagatattgt atttaagtc ctagctcgat acaataaacg 60
ccatttgacc attcaccaca ttggtgtgca cctccatgca t 101

```

<210> 7

<211> 269

<212> DNA

<213> Simian virus 40

<400> 7

```

caattggatc tgctgtggaa tgtgtgtcag ttaggggtgt gaaagtcccc aggtcccca 60
gcaggcagaa gtatgcaaag catgatctc aattagtcag caaccagggt tggaaagtcc 120
ccaggctccc caggcaggcag aagtatgcaa agcatgatc tcaattagtc agcaaccata 180
gtcccccccc taactccgcc catcccgccc ctaactccgc ccagttccgc ccattctccg 240
cccatgggt cagatcctct agggaaattc 269

```

<210> 8

<211> 39

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:PrBac1

<400> 8

cagtgtcgt gcagctcagt gcatgcacgc tcattgccc

39

<210> 9

23

24

<211> 50
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Description of Artificial Sequence:PrBac2
 <400> 9
 gctctagagt cgacaagctt catggctggc tgcggaggaa cagagaaggg 50
 <210> 10
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Description of Artificial Sequence:non
 <400> 10
 tttctgcagt atttgtgca gcgat 25
 <210> 11
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Description of Artificial Sequence:non2
 <400> 11
 acgtctagaa ggcaacgcag cgact 25
 <210> 12
 <211> 26
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Description of Artificial Sequence:non3
 <400> 12
 ctgtctagat aacgcggtca gtcaga 26
 <210> 13
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Description of Artificial Sequence:PrVP2-2
 <400> 13
 gcggatcccc cgcagcgatg acgaacctgc 30
 <210> 14
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Description of Artificial Sequence:PrVP2-3
 <400> 14
 gcgtcgactc acctccttag ggccc 25
 <210> 15
 <211> 45
 <212> DNA

25

26

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:prF1

<400> 15

gctctagagg atccgcatgg gctccagatc ttctaccagg atccc

<210> 16

<211> 34

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:prF2

<400> 16

gcgagctcgg tccatgactg aagactgcta ttgg

<210> 17

<211> 45

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:PrHN1

<400> 17

gcggatcctc ttcatgcatg gaccgcgcag ttagccaagt tgcgc

<210> 18

<211> 60

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:PrHN2

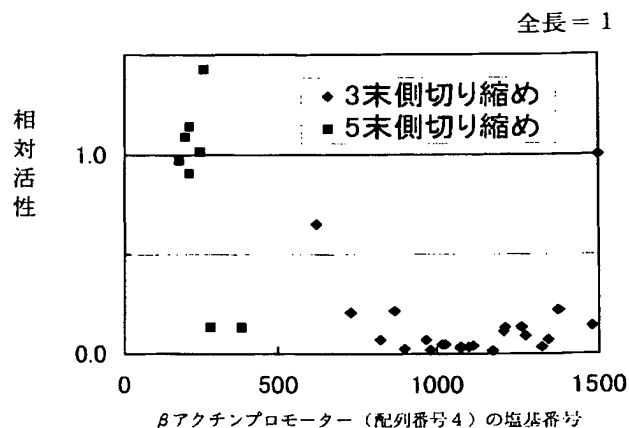
<400> 18

gcggtaccgc atgcgggccc gctagcgagc tcgcgccggt actcagtttg attcttggcg 60

【図面の簡単な説明】

【図 1】 切り縮めたプロモーターの相対活性を示した図である。尚、図中 1 5 0 0 番目は切り縮める前の β -アクトチンプロモータの活性であり、この活性を基準（1.0）とした。

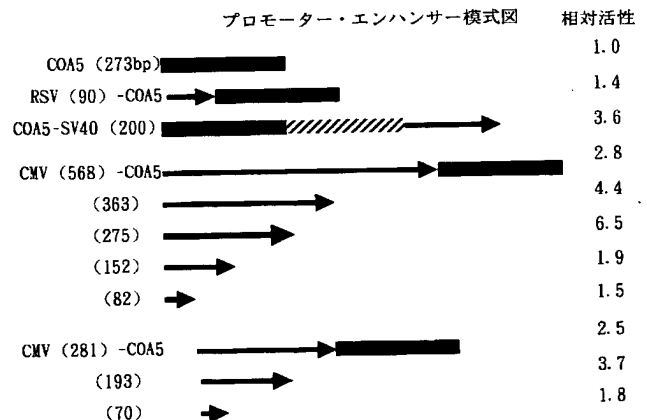
【図 1】



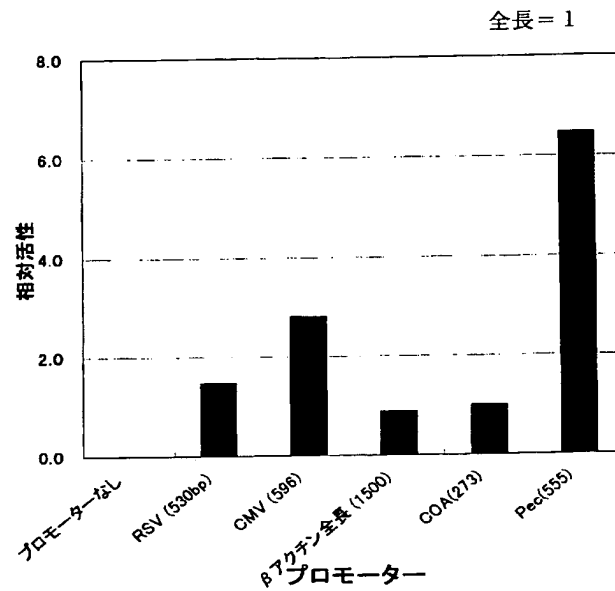
【図 2】 プロモーターとエンハンサーの連結様式と相対活性を示した図である。

【図 3】 本発明のプロモーターと従来のプロモーターとの相対活性を示した図である。

【図 2】



【図3】



フロントページの続き

(51) Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テ-マコード (参考)
A 6 1 K 39/215		A 6 1 K 39/215	
C 0 7 K 14/125		C 0 7 K 14/125	
14/165		14/165	
14/30		14/30	
C 1 2 N 7/00		C 1 2 N 7/00	

F タ-ム (参考) 4B024 AA01 BA31 CA04 DA02 EA04
 FA02 GA14 HA01
 4B065 AA90X AA95Y AA99Y AB01
 BA03 CA24 CA45
 4C085 AA03 BA48 BA51 BA59 BA71
 CC04 CC08 DD62 EE01 EE03
 GG04
 4H045 AA10 AA30 BA10 CA01 CA11
 DA86 EA31 FA74

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☒ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.